



癌関連線維芽細胞はWnt2を介して大腸癌の進展を制御する

著者	相澤 卓
号	88
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3847号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00126313

氏名	あいざわ たかし 相澤 卓
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成31年3月27日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学専攻
学位論文題目	癌関連線維芽細胞は Wnt2 を介して大腸癌の進展を制御する
論文審査委員	主査 教授 海野 倫明 教授 石田 孝宣 教授 古川 徹

論文内容要旨

固形癌において、癌の進展には癌細胞を取り巻く“癌微小環境”が重要な役割を担っており、近年その構成要因の一つである癌関連線維芽細胞(cancer associated fibroblast: CAF)が癌細胞の浸潤や転移などに関与していることが報告されている。しかしながら、CAFが癌の進展を制御するメカニズムについては十分に解明されていないのが現状である。そのため、本研究ではCAFの初代培養細胞と大腸癌手術検体のホルマリン固定標本を用いて、大腸癌におけるCAFの機能を明らかにすることを目的とした。

まず大腸癌患者の手術検体からCAFおよび正常線維芽細胞(normal fibroblast: NF)を初代培養した。これらの細胞を用いてRNAシーケンスを行い、得られた遺伝子発現プロファイルを解析した。CAFとNFの間には全584個の発現変動遺伝子が同定された。また、Gene Sets Enrichment Analysisを用いて解析したところ、CAFで高発現している遺伝子はWntシグナル経路に関連する遺伝子群に多く含まれており、大腸癌においてCAFがWntシグナル経路に関与していることが示唆された。さらにWntシグナル経路を構成している遺伝子の中でも特にWNT2がCAFで高発現しており、CAFのWnt2発現が癌組織において重要な働きを担っていることが考えられた。次に、癌細胞とCAFの相互作用におけるWnt2の機能を解析するため、免疫組織化学による臨床病理学的検討と*in vitro*での検討を行った。免疫組織化学では、Wnt2は癌細胞にも発現を認めたが、線維組織を含む癌間質で特に高い発現を認めた。2009年から2012年に東北大学病院で手術を施行された171例の大腸癌手術検体を用いて、CAFにおけるWnt2の発現と臨床病理学的因子の検討を行ったところ、CAFでWnt2が高発現していた群では低発現群と比較して、腫瘍の深達度が深く($P < 0.001$)、リンパ節転移を認めた症例を多く認め($P = 0.044$)、TNM Stage III以上の症例が多かった($P = 0.010$)。また、静脈侵襲($P < 0.001$)、肝転移($P = 0.045$)および再発($P = 0.013$)を認めた症例が多く含まれていた。臨床転帰については、無再発生存期間、全生存期間、疾患特異的生存期間ともWnt2高発現群と低発現群の間で有意な差は認めなかったが、無再発生存期間、疾患特異的生存期間はWnt2高発現群で短い傾向が見られた。CAFにおけるWnt2発現は予後規定因子であることは示されなかったが、今回の検討では高発現群で進行度の高い症例が多く、CAFのWnt2発現が大腸癌の浸潤や転移に関与していることが示唆された。続いて、*in vitro*でCAFのWnt2発現が癌細胞に与える影響について検討を行った。WNT2特異的siRNAにより発現抑制したCAFの培養上清を条件培地(conditioned medium: CM)として用いて大腸癌細胞株の増殖能、浸潤能、遊走能に与える影響を検討した。その結果、Wnt2を発現抑制したCAFから得たCMでは癌細胞の浸潤能、遊走

(書式12)

能が有意に低下していた。

以上より、大腸癌において CAF での Wnt2 発現は癌細胞との相互作用を介して癌細胞の浸潤、遊走を促進し、その結果大腸癌の進展を制御していると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目癌関連線維芽細胞は Wnt2 を介して大腸癌の進展を制御する.....

所属専攻・分野名医科学専攻.....・.....消化器外科学.....分野.....

学籍番号.....B5MD5001.....氏名.....相澤.....卓.....

固形癌において癌の進展には癌細胞を取り巻く“癌微小環境”が重要な役割を担っており、近年その構成要因の一つである癌関連線維芽細胞が癌細胞の浸潤や転移などに関与していることが報告されている。しかし、癌関連線維芽細胞が癌の進展を制御するメカニズムについては十分に解明されていない。そのため、大腸癌における癌関連線維芽細胞の機能を明らかにすることを目的とし本研究を行った。

本研究では、まず大腸癌患者の手術検体から癌関連線維芽細胞および正常線維芽細胞を初代培養した。これらの細胞を用いて RNA シークエンスを行い、得られた遺伝子発現プロファイルを Gene Sets Enrichment Analysis で解析したところ、癌関連線維芽細胞で高発現している遺伝子が Wnt シグナル経路に関連する遺伝子群に多く含まれていた。さらには Wnt シグナル経路を構成している遺伝子の中でも特に WNT2 が癌関連線維芽細胞で高発現していた。

続いて、癌組織における Wnt2 の機能を解析するため、免疫組織化学による臨床病理学的検討と *in vitro* での検討を行った。免疫組織化学による検討では、癌関連線維芽細胞において Wnt2 が高発現していた群では低発現群と比較し、腫瘍の深達度が深く ($P < 0.001$)、リンパ節転移を認めた症例を多く認め ($P = 0.044$)、Stage III 以上の症例が多かった ($P = 0.010$)。また、Wnt2 高発現群では静脈侵襲 ($P < 0.001$)、肝転移 ($P = 0.045$) および再発 ($P = 0.013$) を認めた症例が多く含まれていた。WNT2 特異的 siRNA により発現抑制した癌関連線維芽細胞を用いた *in vitro* の解析では、siRNA を導入した癌関連線維芽細胞の培養上清を条件培地として用いて大腸癌細胞株の培養を行ったところ、Wnt2 を発現抑制した癌関連線維芽細胞から得た条件培地では癌細胞の浸潤能、遊走能が有意に低下した。

以上より、本研究は大腸癌における癌関連線維芽細胞について Wnt2 発現に着目し、癌関連線維芽細胞における Wnt2 発現が癌細胞の遊走および浸潤を誘導して大腸癌の進展を制御することを示したものであり、学位に値する内容であると判断する。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。